



PCT/FR 03 / 03651

REC'D 23 FEB 2004

WIPO PCT

# BREVET D'INVENTION

**CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION**

## COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 15 DEC. 2003**DOCUMENT DE PRIORITÉ**

PRÉSENTÉ OU TRANSMIS  
CONFORMÉMENT À LA  
RÈGLE 17.1.a) OU b)

Pour le Directeur général de l'Institut  
national de la propriété industrielle  
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT  
NATIONAL DE  
LA PROPRIÉTÉ  
INDUSTRIELLE

SIEGE  
26 bis, rue de Saint Petersburg  
75800 PARIS cedex 08  
Téléphone : 33 (0)1 53 04 53 04  
Télécopie : 33 (0)1 53 04 45 23  
www.inpi.fr



26 bis, rue de Saint Pétersbourg  
75800 Paris Cedex 08  
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04 Télécopie : 33 (1) 42 94 86 54

# BREVET D'INVENTION CERTIFICAT D'UTILITÉ

Code de la propriété intellectuelle - Livre VI



N° 11354\*03

## REQUÊTE EN DÉLIVRANCE page 1/2

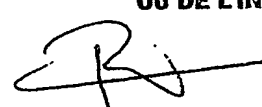


Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 540 W / 210532

<b>REMISE DES PIÈCES</b> DATE <b>10 DEC 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0215613</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI DATE DE DÉPÔT ATTRIBUÉE <b>10 DEC. 2002</b> PAR L'INPI		<input checked="" type="checkbox"/> <b>NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE</b>  <b>Cabinet REGIMBEAU</b> <b>20, rue de Chazelles</b> <b>75847 PARIS CEDEX 17</b> <b>FRANCE</b>	
<b>Vos références pour ce dossier</b> (facultatif) <b>240204 D20785 ANB</b>			
<b>Confirmation d'un dépôt par télécopie</b>		<input type="checkbox"/> N° attribué par l'INPI à la télécopie	
<b>2 NATURE DE LA DEMANDE</b>		<b>Cochez l'une des 4 cases suivantes</b>	
Demande de brevet		<input checked="" type="checkbox"/>	
Demande de certificat d'utilité		<input type="checkbox"/>	
Demande divisionnaire		<input type="checkbox"/>	
<i>Demande de brevet initiale</i>		N° _____ Date _____	
<i>ou demande de certificat d'utilité initiale</i>		N° _____ Date _____	
Transformation d'une demande de brevet européen <i>Demande de brevet initiale</i>		<input type="checkbox"/> N° _____ Date _____	
<b>3 TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)</b> <b>PROCEDE DE PREPARATION D'UN EXTRAIT DE CENTELLA ASIATICA RICHE EN MADECASSOSIDE ET EN TERMINOLOSIDE.</b>			
<b>4 DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE FRANÇAISE</b>		Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ Date _____ Pays ou organisation _____ N° _____ <input type="checkbox"/> <b>S'il y a d'autres priorités, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>	
<b>5 DEMANDEUR (Cochez l'une des 2 cases)</b>		<input checked="" type="checkbox"/> <b>Personne morale</b> <input type="checkbox"/> <b>Personne physique</b>	
Nom ou dénomination sociale Prénoms Forme juridique N° SIREN Code APE-NAF  Domicile ou siège Nationalité N° de téléphone (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		ROCHE CONSUMER HEALTH Ltd.    Wurmisweg, 4303 Kaiseraugst  SUISSE Suisse N° de télécopie (facultatif)  <input type="checkbox"/> <b>S'il y a plus d'un demandeur, cochez la case et utilisez l'imprimé «Suite»</b>	

Remplir impérativement la 2<sup>ème</sup> page

REMISE DES PIÈCES DATE <b>10 DEC 2002</b> LIEU <b>75 INPI PARIS B</b> N° D'ENREGISTREMENT <b>0215613</b> NATIONAL ATTRIBUÉ PAR L'INPI		Réservé à l'INPI	CB 540 V7 : 210502
<b>6 MANDATAIRE (s'il y a lieu)</b> Nom Prénom Cabinet ou Société N° de pouvoir permanent et/ou de lien contractuel Adresse Rue Code postal et ville Pays N° de téléphone (facultatif) N° de télécopie (facultatif) Adresse électronique (facultatif)		240204 ANB Cabinet REGIMBEAU 20, rue de Chazelles 75847 PARIS CEDEX 17 01 44 29 35 00 01 44 29 35 99 info@regimbeau.fr	
<b>7 INVENTEUR (S)</b> Les demandeurs et les inventeurs sont les mêmes personnes		Les inventeurs sont nécessairement des personnes physiques <input type="checkbox"/> Oui <input checked="" type="checkbox"/> Non : Dans ce cas remplir le formulaire de Désignation d'inventeur(s)	
<b>8 RAPPORT DE RECHERCHE</b> Établissement immédiat ou établissement différé		Uniquement pour une demande de brevet (y compris division et transformation) <input checked="" type="checkbox"/> Établissement immédiat <input type="checkbox"/> Établissement différé	
Paiement échelonné de la redevance (en deux versements)		Uniquement pour les personnes physiques effectuant elles-mêmes leur propre dépôt <input type="checkbox"/> Oui <input type="checkbox"/> Non	
<b>9 RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES</b>		Uniquement pour les personnes physiques <input type="checkbox"/> Requête pour la première fois pour cette invention (joindre un avis de non-imposition) <input type="checkbox"/> Obtenue antérieurement à ce dépôt pour cette invention (joindre une copie de la décision d'admission à l'assistance gratuite ou indiquer sa référence) : AG	
<b>10 SÉQUENCES DE NUCLEOTIDES ET/OU D'ACIDES AMINÉS</b> Le support électronique de données est joint La déclaration de conformité de la liste de séquences sur support papier avec le support électronique de données est jointe		<input type="checkbox"/> Cochez la case si la description contient une liste de séquences <input type="checkbox"/>	
Si vous avez utilisé l'imprimé «Suite», indiquez le nombre de pages jointes		92-1001	
<b>11 SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE</b> (Nom et qualité du signataire)		<b>VISA DE LA PRÉFECTURE OU DE L'INPI</b> 	

La présente invention concerne un procédé de préparation d'un extrait contenant un  
 5 mélange de madécassoside et de terminoloside, un extrait de *Centella asiatica*  
 comprenant plus de 95% en masse d'un mélange de madécassoside et de terminoloside  
 par rapport au poids total de l'extrait et son utilisation dans la régulation des  
 mécanismes inflammatoires.

10 *Centella asiatica*, encore connue sous le nom de Violette marronne (Ile de la Réunion)  
 de Gotu Kola ou d'Indian Pennywort (Inde) ou de *Centella repanda* (Amérique du  
 Nord) et de Talapetraka (Madagascar), est une herbe polymorphe qui pousse à l'état  
 sauvage dans des régions humides et ombragées à une altitude idéale de 600 mètres.

*Centella asiatica* appartient à la famille des Ombellifères (Apiacées), particulièrement à  
 15 la sous famille des Hydrocotyles. *Centella* correspond au nom du genre de la plante,  
 alors que *asiatica* correspond à son espèce. *Centella asiatica* inclut trois variétés  
 dénommées *Typica*, *Abyssinica* et *Floridana*.

*Centella asiatica* est connue et utilisée par les médecines traditionnelles malgache,  
 indienne, chinoise, amérindienne ou indonésienne depuis plus de 3000 ans. Elle  
 20 présente des utilisations variées et diverses selon les pays. Elle est particulièrement  
 intéressante pour ces propriétés cicatrisantes, sédatives, analgésiques, anti-dépressives,  
 anti-virales et anti-microbiennes. Elle est généralement utilisée par voie topique ou par  
 voie orale.

Paradoxalement, l'apparition de *Centella asiatica* dans la médecine moderne  
 25 occidentale fut tardive, puisqu'elle ne fit son entrée au Codex qu'en 1884, et que le  
 premier extrait sec ne fut réalisé qu'en 1941.

Les actifs de *Centella asiatica* sont des triterpènes pentacycliques, qui se trouvent à  
 l'état de génines, ce sont les acides asiatique et madécassique, et d'hétérosides, ce sont  
 l'asiaticoside et le madécassoside.

30 Les molécules d'asiaticoside, de madécassoside, d'acide asiatique et d'acide  
 madécassique participent aux défenses naturelles de la plante. Pour pouvoir exploiter  
 industriellement les actifs de *Centella asiatica* de manière satisfaisante, il est donc

indispensable de collecter la plante à l'état sauvage, un stress environnemental étant nécessaire pour que cette plante vivace présente une teneur en triterpènes importante.

Les hétérosides de *Centella asiatica*, madécassoside et asiaticoside, sont des complexes sucrés qui constituent les formes de réserve de l'acide madécassique et de l'acide asiatique de la plante, synthétisés essentiellement, en saison humide. L'agression de la

5 plante par des bactéries, des levures ou des champignons active les hydrolases libératrices des génines.

Les molécules triterpéniques sont particulièrement intéressantes du fait de leur action régulatrice et activatrice de la synthèse de collagènes. Les génines et hétérosides

10 extraits de *Centella asiatica* favorisent notamment la synthèse des collagènes 1 et 3. Ces actifs sont utilisés dans le domaine pharmaceutique principalement pour faciliter la cicatrisation et dans le traitement de l'insuffisance veineuse. Ils sont utilisés dans le domaine cosmétique principalement en tant qu'agent anti-rides et anti-cellulite.

15 Les actifs de *Centella asiatica* les plus couramment utilisées dans l'art antérieur sont les acides asiatique et madécassique, ainsi que l'asiaticoside. Le madécassoside étant très soluble dans l'eau, il est le plus souvent entraîné dans les eaux de lavage au cours des procédés d'extraction classiques des actifs liposolubles.

20 Les procédés de l'art antérieur permettent l'obtention d'un mélange d'asiaticoside et de madécassoside. Ce mélange comprend environ 25% en poids d'asiaticoside, 60% en poids de madécassoside et 15% en poids de produits secondaires, principalement constitués d'acides gras et d'osides, par rapport au poids total du mélange.

D'autres procédés de l'art antérieur permettent aussi l'obtention de madécassoside pur

25 à 81% en poids par rapport au poids total de l'extrait, ledit extrait comprenant en outre des isomères proches du madécassoside, des acides gras, principalement des acides linoléique, linolénique, palmitique ou oléique, et des sucres tels que des osides.

De manière surprenante, la demanderesse a mis au point un nouveau procédé

30 d'extraction qui permet l'obtention d'un mélange de madécassoside et d'une nouvelle molécule que l'on a appelé terminolosite, ledit mélange étant pur à plus de 95% en masse par rapport au poids total du mélange.

De la même manière, la demanderesse a découvert un extrait de *Centella asiatica* comprenant un mélange de madécassoside et de terminoloside.

De manière surprenante, la demanderesse a également découvert que le mélange de madécassoside et de terminoloside extrait des parties aériennes de *Centella asiatica* pouvait être utilisé dans un médicament pour réguler les mécanismes inflammatoires. En outre, le mélange de madécassoside et de terminoloside extrait des parties aériennes de *Centella asiatica* peut également être utilisé dans une composition cosmétique pour prévenir et retarder le vieillissement prématuré de la peau.

Dans le cadre de la présente invention, on entendra par terminoloside la molécule chimique de nom général  $2\alpha, 3\beta, \beta, 23$ -tetrahydroxy oléa-12-ène 28-oate de  $1[\text{O-}\alpha\text{-L-rhamnopyranosyl-(1-4)-O-}\beta\text{-glucopyranosol-(1-6)]\text{-O-}\beta\text{-D-glucopyranose}$ .

Cette molécule présente le même enchaînement sucré que le madécassoside, à savoir un enchaînement glucose-glucose-rhamnose. La structure du cycle terpénique du terminoloside correspond à celle du cycle terpénique de l'acide terminolique.

Le terminoloside est ainsi un isomère de position du madécassoside.

Cette molécule n'a jamais été isolée dans l'art antérieur.

De plus, le terminoloside n'a jamais été cité comme étant un extrait éventuel de *Centella asiatica* et, par voie de conséquence, aucun procédé d'extraction de terminoloside à partir de *Centella asiatica* n'est connu.

Dans le cadre de la présente invention, l'extrait tel que défini est constitué d'un mélange de deux molécules d'origine naturelle qui sont le madécassoside et le terminoloside en mélange.

25

La présente invention a ainsi pour objet un procédé de préparation d'un extrait contenant un mélange de madécassoside et de terminoloside, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :

a) extraction des parties aériennes de *Centella asiatica* au moyen d'un solvant alcoolique ;

b) passage sur résine anionique de la solution alcoolique obtenue à l'étape a) ;

- c) délipidation sélective par extraction liquide/liquide de l'éluat obtenu à l'étape b) ;
- d) concentration de la phase hydro-alcoolique délipidée jusqu'en phase aqueuse avec filtrations successives ;
- 5 e) passage successif sur résine cationique puis sur résine anionique de la phase aqueuse obtenue à l'étape d) ;
- f) stabilisation de la phase aqueuse obtenue à l'étape e) par addition d'alcool ;
- g) chromatographie sélective de la phase hydro-alcoolique pré-purifiée obtenue à l'étape f) ;
- 10 h) récupération du mélange de madecassoside et de terminoloside dans sa forme finale.

L'extraction des principes actifs de la plante de *Centella asiatica* est réalisée avantageusement à partir des parties aériennes de la plante, dans le but principal de ne  
 15 pas détériorer ses racines et ainsi de permettre le renouvellement naturel de cette plante vivace.

Dans une variante avantageuse du procédé selon l'invention, les parties aériennes sont mises à macérer dans un solvant alcoolique avant l'étape d'extraction. Les solvants alcooliques, qui peuvent être utilisés selon la présente invention, sont ceux  
 20 traditionnellement usités par l'homme du métier, tel que l'éthanol et notamment l'éthanol à 70%.

La solution alcoolique ainsi obtenue est ensuite purifiée au moyen d'un passage sur une résine anionique.

25 La résine anionique utilisée dans le procédé selon l'invention est avantageusement une résine anionique forte possédant des groupements fonctionnels du type ammonium quaternaire.

Ce passage de la solution alcoolique sur une résine anionique permet le piégeage des substances anioniques secondaires, notamment des substances phénoliques.

30 Selon une variante avantageuse du procédé selon l'invention, la solution alcoolique obtenue suite à l'étape a) est clarifiée avant de passer sur la résine anionique. Cette étape avantageuse de clarification consiste à ajouter à ladite solution alcoolique une

5 solution de base forte, telle qu'une solution d'hydroxyde de sodium, et du charbon activé. L'ajout de bases fortes permet la précipitation, et ainsi l'élimination par filtration, des métaux et des autres substances présentes susceptibles de réagir avec ces bases fortes. L'ajout de charbon activé permet en plus de décolorer, en la purifiant, la solution alcoolique de fixer des acides gras ou des produits d'oxydation.

10 Suite à l'étape b) de passage sur résine, avantageusement précédée d'une étape de clarification, l'éluat obtenu est purifié de ces fractions grasses. Pour cela, il est soumis à une extraction liquide/liquide. Le solvant d'extraction utilisé est un solvant apolaire, avantageusement un alcane tel que l'heptane. Tous les procédés d'extraction liquide/liquide connus de l'homme du métier peuvent être mis en place dans le cadre du présent procédé selon l'invention. Notamment, ladite extraction peut être une centrifugation.

15 Le madécassoside étant hydrosoluble, on récupère la phase hydro-alcoolique.

La phase hydro-alcoolique ainsi obtenue est ensuite concentrée jusqu'en phase aqueuse et filtrée successivement, avantageusement plusieurs fois de suite, pour permettre la précipitation des composés insolubles dans la phase aqueuse.

20 Suite à ces premières étapes du procédé selon l'invention, on obtient une phase aqueuse dans laquelle les deux hétérosides connus de *Centella asiatica*, à savoir l'asiaticoside et le madécassoside, ainsi que le terminoloside sont solubles.

Cette phase aqueuse est ensuite purifiée par passage successif sur une résine cationique puis sur une résine anionique.

25 Avantageusement, la résine cationique utilisée est une résine cationique forte possédant des groupements fonctionnels du type sulfonates.

De manière avantageuse, la résine anionique utilisée est une résine anionique forte possédant des groupements fonctionnels du type ammonium quaternaire.

30 Dans le cadre du procédé selon l'invention, l'ordre des résines échangeuses d'ions est important afin d'améliorer la fixation de fractions acides résiduelles.



La phase aqueuse ainsi obtenue est ensuite stabilisée par ajout d'alcool. On obtient alors une phase hydro-alcoolique pré-purifiée dans laquelle les deux hétérosides connus de *Centella asiatica* et le terminolosite sont solubles.

5 Selon une variante avantageuse de l'invention, suite aux passages successifs sur résine cationique puis anionique de l'étape e) et avant l'étape f), la phase aqueuse obtenue est aussi mis à passer au travers de charbon activé. Le charbon activé permet ainsi le captage des composés phénoliques secondaires responsables de la coloration de la solution.

10 Selon une autre variante avantageuse de l'invention, la phase aqueuse obtenue suite à l'étape e), avant l'étape f), et éventuellement suite à une étape de passage sur charbon activé, subit une ou plusieurs étape(s) de concentration.

15 La phase hydro-alcoolique pré-purifiée ainsi obtenue est ensuite purifiée par chromatographie sélective. La technique de chromatographie sélective est bien connue de l'homme du métier. Elle permet de séparer les molécules selon leur affinité avec la phase stationnaire.

Dans le cadre de la présente invention, l'éluant utilisé lors de la chromatographie sélective est un solvant polaire. Avantageusement, le solvant est un mélange d'eau et d'éthanol dans des proportions en eau/éthanol variant de 50/50 à 90/10 et typiquement,  
20 75/25 en volume / volume.

Dans le cadre de la présente invention, la phase stationnaire utilisée lors de la chromatographie sélective est une phase stationnaire apolaire. Avantageusement, la phase stationnaire est constituée de silices apolaires greffées. Les greffons apolaires ont avantageusement 2 à 18 atomes de carbone, et encore plus avantageusement 12 à  
25 18 atomes de carbones.

Suite à ces étapes de procédé, un mélange de madécassoside et de terminolosite est obtenu.

Avantageusement, ce mélange est obtenu avec une pureté supérieure à 95% en masse  
30 par rapport au poids total de l'extrait.

La présente invention a également pour objet un extrait de *Centella asiatica* susceptible d'être obtenu par le procédé tel que décrit précédemment et contenant plus de 95% en masse d'un mélange de madécassoside et de terminoloside.

5 Selon une variante avantageuse de l'invention, le mélange de madécassoside et de terminoloside a un rapport massique en madécassoside par rapport au totum compris entre 30% et 70% en masse de madécassoside.

Avantageusement, l'extrait selon l'invention est un agent anti-inflammatoire et immuno-modulateur.

10

La présente invention a aussi pour objet un médicament comprenant un extrait de *Centella asiatica* tel que décrit précédemment et un support pharmaceutiquement acceptable.

15 Lorsqu'un corps étranger, tel qu'une bactérie ou un virus, pénètre dans notre organisme, ce dernier met en marche un système de défense, appelé système immunitaire, pour le combattre. Le système immunitaire doit éliminer le corps étranger sans pour autant détruire son propre organisme. Dans une maladie auto-immune, le système immunitaire ne reconnaît plus comme siennes certaines structures « de soi » de l'organisme, il se dérègle et devient capable d'agresser ces structures « de soi ».

20 Dans le cas particulier du psoriasis, les antigènes de l'organisme, circonvenus par la défense immunitaire, agressent la peau du sujet, ce qui entraîne une dérive inflammatoire. L'hyperréaction du système régulateur entraîne une hyperprolifération des kératinocytes et donc la formation de plaques très épaisses et non homogènes de kératinocytes et de cornéocytes.

25 Le médicament selon l'invention est destiné à inhiber la production pathologique des défenses immunitaires.

Ledit médicament est avantageusement destiné à réguler les mécanismes inflammatoires.

30 De manière encore plus avantageuse, ledit médicament est destiné au traitement des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires chroniques ou des maladies intestinales.

Avantageusement, ledit médicament est destiné au traitement du psoriasis, du vitiligo, du pityriasis, des sclérodermies, des dermatoses bulleuses ou de l'arthrite rhumatoïde.

Dans le domaine de la dermatologie, le médicament selon l'invention est aussi destiné à la prévention et au traitement des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.

Ledit médicament est avantageusement destiné à la prévention et au traitement des maladies choisies parmi les sensibilisations anaphylactiques, les anomalies pigmentaires de la peau, l'hypervascularisation dermique et les fissurations inflammatoires.

Ledit médicament est aussi avantageusement destiné à réguler l'homéostasie tissulaire dermique, via une protection et une stimulation cellulaire ayant pour conséquence l'amélioration de la matrice extra-cellulaire contribuant au dialogue dermo-épidermique.

15

La présente invention a aussi pour objet une composition cosmétique comprenant un extrait de *Centella asiatica* tel que décrit précédemment et un support cosmétiquement acceptable.

Ladite composition cosmétique est utilisée avantageusement pour prévenir toute dérive pathologique auto-immune pouvant résulter du vieillissement naturel de la peau.

Ladite composition cosmétique est également utilisée avantageusement pour retarder le vieillissement naturel au niveau de l'amélioration de la fonctionnalité cellulaire.

Ladite composition cosmétique est utilisée encore plus avantageusement pour prévenir le vieillissement accéléré de la peau soumise aux agressions extérieures, notamment pour prévenir le vieillissement photo-induit de la peau.

Le milieu extérieur agresse en permanence la peau, que ce soit via un rayonnement ultraviolet ou via le rayonnement émis par les lampes à décharge ou les divers antigènes atmosphériques naturels ou existants du fait de l'activité humaine, la pollution urbaine, etc., ce qui engage des processus biologiques d'accélération du vieillissement naturel. Le système anti-inflammatoire est ainsi en action de manière permanente, ce qui entraîne une accélération du renouvellement des kératinocytes de la peau, voir une hyperprolifération, aggravant l'entropie du tissu par une surexpression

de protéines spécifiques et à terme une déperdition de fonctionnalité. La conséquence en est, un renouvellement épuisant des réserves naturelles de cellules de kératinocytes et l'entraînement d'un vieillissement prématuré de la peau.

L'utilisation cosmétique de la composition selon l'invention permet avantageusement d'inhiber les désordres inflammatoires et ainsi de prévenir le vieillissement de la peau

Le médicament ou la composition cosmétique se présente avantageusement sous une forme solide, pâteuse ou liquide.

Avantageusement selon la présente invention, le médicament ou la composition cosmétique est formulée pour être administré par voie topique, orale, sous-cutanée, injectable, rectale et génitale.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le médicament ou la composition cosmétique est formulé pour être administré par voie topique, ledit médicament ou ladite composition se présente sous forme de solution aqueuse, de crème blanche ou colorée, de pommade, de lait, de lotion, de gel, d'onguent, de sérum, de pâte, de mousse, d'aérosol, de shampoing ou de stick.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le médicament ou la composition cosmétique est formulé pour être administré par voie orale, ledit médicament ou ladite composition peut se présenter sous la forme de solution aqueuse, émulsion, comprimés, gélules, capsules, poudres, granules, solutions ou encore de suspensions orales.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le médicament ou la composition cosmétique est formulé pour être administré par voie sous-cutanée, ledit médicament ou ladite composition peut se présenter sous la forme d'ampoules injectables stériles.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le médicament ou la composition cosmétique est formulé pour être administré par voie rectale, ledit médicament ou ladite composition peut se présenter sous la forme de suppositoires.

De manière avantageuse selon la présente invention, lorsque le médicament ou la composition cosmétique est formulé pour être administré par voie génitale, ledit médicament ou ladite composition peut se présenter sous la forme d'ovules.

La quantité du médicament selon l'invention à administrer dépend de la gravité et de l'ancienneté de l'affection traitée. Naturellement, le médecin adaptera aussi la posologie en fonction du malade.

- Le traitement de patients souffrant d'une maladie auto-immune, par l'extrait de
- 5 Centella asiatica contenant plus de 95% en masse du mélange de madécassoside et de terminoloside par rapport au poids total du mélange, consiste notamment en l'administration topique dudit médicament à raison de 1 à 3% en poids, par rapport au volume de l'excipient, dudit extrait dans le véhicule transdermique, par jour en une ou plusieurs fois.
- 10 D'une manière particulièrement avantageuse, l'administration dudit médicament à des doses telles que définies ci-dessus est répartie en 1 à 3 administrations quotidiennes.

Les exemples suivant illustrent l'invention sans toutefois en limiter la portée.

**Exemple 1: composition d'une crème de soin cosmétique selon l'invention**

<b>Ingrédients : INCI</b>	<b>w/w %</b>
Extrait selon l'invention	1.0%
Beheneth - 10	1.5 %
Beheneth - 25	1.5%
Dicaprylyl Carbonate	5.0%
Hexyl Laurate	5.0%
Isohexadecane	5.0%
Cetearyl Isononaoate	5.0%
Dimethicone	1.0%
Behenyl Alcohol	2.0%
Hydrogenated Vegetable Glycerides	2.0%
Phenoxyethanol & parabens	0.5%
Tocopheryl Acetate	0.5%
Eau déminéralisée	qsp 100
Glycerin	3.0%
Butylen Glycol	2.0%
Xanthan gum	0.1%
Carbomer	0.2%

5 **Exemple 2: composition d'une crème de soin cosmétique selon l'invention**

<b>Ingrédients : INCI</b>	<b>w/w %</b>
Extrait madecassoside/terminoloside	1%
Cetearyl Glucoside & Cetearyl Alcohol	5.0%
Caprylic/Capric Trygliceride	5.0%
squalane	5.0%
Cetearyl Isononanoate	3.0%
Dimethicone crosspolymere	2.0%
Stearyl Alcohol	1.5%
Dicaprylyl Carbonate	5.0%
Parabens	0.1%
Eau déminéralisée	qsp 100
Phenoxyethanol & Parabens	0.5%
Glycerine	2.0%
Carbomere	0.3%
PEG 32	2.0%
Xanthan Gum	0.2%
Aluminium starch octenylsuccinate	2.0%

**Exemple 3 : Procédé d'extraction d'un mélange de madécassoside et de terminoloside pur à plus de 95% en masse par rapport au poids total de l'extrait :**

**a) Défécation et purification sur colonne du jus alcoolique initial**

5

Les parties aériennes de *Centella asiatica* utilisées dans cet exemple comprennent les feuilles avec environ 2 à 3 cm de tige.

250 kg de parties aériennes de *Centella asiatica* sont séparés en trois lots de quantités égales.

10

Les principes actifs de *Centella asiatica* sont extraits de ses parties aériennes selon le principe de l'extraction à contre-courant. Un lot de parties aériennes de *Centella asiatica* neuves, c'est-à-dire n'ayant encore subi aucune macération ni aucune filtration et donc très riche en principes actifs, est extrait une fois avec un jus de deuxième extraction, c'est-à-dire un solvant appauvri en presque saturé en principes actifs. Le jus ainsi obtenu, que l'on appelle jus final, est ensuite directement envoyé dans une cuve de défécation. Le lot est ensuite soumis à une deuxième extraction avec un jus de première macération, c'est-à-dire un jeu moins chargé que le jus utilisé précédemment et donc apte à solubiliser plus de principes actifs. C'est ce jus qui sert de jus de deuxième extraction. Le lot est enfin soumis à une troisième extraction avec un solvant neuf et ainsi apte à solubiliser les dernier pourcentages de principes actifs encore présents dans le lot. C'est ce jus qui sert de jus de première extraction.

20

Dans le cadre de cet exemple le solvant de macération et de filtration utilisé est de l'éthanol à 70%. Pour 250 kg de parties aériennes de *Centella asiatica*, on utilise 1600L d'éthanol à 70%.

25

Suivant si l'étape précédente d'extraction est réalisée en cuve statique ou en cuve dynamique, le temps de macération des parties aériennes de *Centella asiatica* dans l'éthanol à 70%, plus ou moins saturé en principes actifs, varie de un jour à quelques heures. Dans le cas particulier de cuves dynamiques chauffées à une température de 60°C, le temps de macération est de deux heures.

30

On ajoute ensuite au jus final 10 L d'une solution d'hydroxyde de sodium à 30 % puis 10 kg de charbon activé, qui permet par agitation de décolorer la solution.

La solution est laissée sous agitation 40 minutes puis elle est filtrée.

On passe le filtrat à travers une résine anionique forte, possédant des groupements  
5 fonctionnels du type ammonium quaternaire, à un débit de 300L/h.

L'éluat hydro-alcoolique ainsi obtenu est ensuite neutralisé par l'hydroxyde de sodium à un pH apparent compris entre 5,3 et 6,9 puis soumis à une extraction liquide/liquide qui est avantageusement centrifuge, par de l'heptane.

La phase dégraissée ainsi obtenue est concentrée au moyen d'une évaporation continue  
10 sous pression réduite à une température ne dépassant pas 70°C. Cette concentration permet d'éliminer l'asiaticoside contenu dans la phase dégraissée. On concentre jusqu'à récupérer un volume d'éthanol correspondant à environ 90% en volume du volume initial de la phase dégraissée et jusqu'à la précipitation dans la phase dégraissée de l'asiaticoside. Cette phase est ensuite filtrée et on récupère les eaux-  
15 mères. Le madécassoside est tellement hydrosoluble qu'il solubilise environ 20% en masse de l'asiaticoside ayant précipité lors de l'étape précédente de concentration.

#### **b) Etapes de préparation d'une phase hydro-alcoolique pré-purifiée**

20 La phase aqueuse concentrée récupérée est purifiée par passage sur résine cationique puis sur résine anionique.

La résine cationique est une résine cationique forte possédant des groupements fonctionnels du type sulfonates

La résine anionique est une résine anionique forte possédant des groupements  
25 fonctionnels du type ammonium quaternaire.

L'éluat ainsi obtenu est une phase hydroalcoolique qui est ensuite neutralisée par l'acide chlorhydrique à un pH compris entre 6,75 +/- 0,25 et décolorée par passage sur du charbon activé.

La solution ainsi obtenue est filtrée puis concentrée, en réacteur sous pression réduite,  
30 jusqu'à l'obtention d'une phase aqueuse selon le même principe que la concentration précédente. Elle est ensuite réajustée par ajout d'éthanol afin d'obtenir une solution hydro-alcoolique stabilisée ayant une teneur en matières sèches de 200 g +/- 20 par



litre et un pourcentage d'alcool de 35% +/- 3,5 % volume / volume On obtient ainsi une phase pré-purifiée riche en madécassoside et en terminoloside et contenant encore de l'asiaticoside.

### 5 c) Etape de purification

La phase hydro-alcoolique pré-purifiée ainsi obtenue est ensuite soumise à une séparation par chromatographie sélective.

10 Lors de cette chromatographie sélective, la phase stationnaire utilisée est une phase constituée de silices apolaires greffées, les greffons apolaires ayant 18 atomes de carbone et mesurant 10µm. Le solvant utilisé est un mélange d'eau à 65% en volume et d'éthanol à 35% en volume par rapport au volume total du mélange.

L'éluat ainsi obtenu est ensuite concentré, séché, broyé. Ces différentes étapes permettent l'obtention d'un extrait sec de Centella asiatica.

15 L'extrait sec contient 99,8% en masse, par rapport au poids total de l'extrait, d'un mélange 51:49 en masse de madécassoside et de terminoloside.

### 20 Exemple 4 : évaluation des effets modulateurs du mélange de madécassoside et de terminoloside vis-à-vis de la croissance cellulaire de kératinocytes humains hyperprolifératifs :

Dans cet exemple ainsi que dans les exemples suivants, l'extrait contient 99.8 % du mélange de madécassoside et de terminoloside en poids selon l'invention par rapport  
25 au poids total de l'extrait ; ledit mélange contenant 51% en poids de madécassoside et 49% en poids de terminoloside, par rapport au poids total du mélange.

L'extrait selon l'invention contenant principalement le mélange de madécassoside et de terminoloside, ledit extrait sera indifféremment désigné, dans cet exemple ainsi que dans les exemples suivants, sous l'expression un mélange de madécassoside et de  
30 terminoloside ou sous l'expression un mélange selon l'invention.

Le sujet de cet exemple est d'évaluer les effets modulateurs du mélange de madécassoside et de terminoloside vis-à-vis de la croissance cellulaire des kératinocytes humains hyperprolifératifs.

L'exemple a été réalisé sur des kératinocytes humains HaCaT stimulés par le  
 5 Keratinocyte Growth Factor (ci après dénommé KGF) et/ou l'Elastase Humaine Leucocytaire (ci après dénommée EHL).

**a) Etude de la cytotoxicité du mélange de madécassoside et de terminoloside**

10

Cette étude de cytotoxicité consiste à déterminer la dose maximale de produit n'entraînant pas de toxicité cellulaire. La cytotoxicité a été étudiée sur des kératinocytes humains HaCaT ensemencés dans des plaques 96-puits à raison de  $20 \times 10^3$ , gamme large, et  $10 \times 10^3$ , gamme restreinte, cellules par puits. La viabilité  
 15 cellulaire est évaluée par un test colorimétrique au Rouge Neutre.

Le Rouge Neutre est un colorant faiblement cationique qui pénètre les membranes cellulaires par un phénomène de diffusion non ionique et qui se fixe au niveau intracellulaire sur les groupements phosphate et/ou carboxylique de la matrice lysosomiale. Des modifications dans l'accumulation et la rétention du Rouge Neutre  
 20 sont observées lorsque les membranes cellulaires sont endommagées. La densité optique de la solution obtenue après incubation des cellules en présence de Rouge Neutre est donc proportionnelle au nombre de cellules vivantes.

Une gamme large de 9 concentrations, de 0,001 à 1 mg/ml, a été testée dans un premier temps. Les différentes solutions-tests ont été préparées dans du milieu DMEM,  
 25 Dubelco Modified Essential Medium, additionné de 10% en volume de SVF, sérum de veau fœtal. Après 24 heures de contact, les concentrations inférieures ou égales à 1 mg/ml n'induisent aucune modification significative de la réponse cellulaire vis-à-vis de Rouge Neutre. Une très faible diminution de la capture du Rouge Neutre, correspondant à 10% d'inhibition, est observée uniquement à la plus forte  
 30 concentration testée de 1 mg/ml.

A partir de ces résultats, une gamme restreinte, entre 0,05 et 5 mg/ml, a été établie afin de préciser la dose maximale non cytotoxique. La viabilité cellulaire est évaluée par un

test colorimétrique au Rouge Neutre, après 72 heures d'incubation. Les résultats confirment la non toxicité des concentrations inférieures ou égales à 1mg/ml. A partir de 1 mg/ml, on observe un léger effet cytotoxique dose-dépendant. La plus forte concentration testée, 5 mg/ml, inhibe de 43% la réponse cellulaire vis-à-vis du Rouge Neutre.

Une seconde gamme restreinte comprise entre 0,075 et 5 mg/ml a été testée. L'essai a été réalisé sur des cellules HaCaT, après solubilisation du mélange de madécassoside et de terminoloside dans du diméthylsulfoxyde, ci après dénommé DMSO, à une concentration de 1%. La viabilité cellulaire est évaluée par un test colorimétrique au Rouge Neutre, après 72 heures d'incubation. Les résultats obtenus sont similaires à ceux enregistrés en absence de DMSO.

Le tableau ci-dessous regroupe l'ensemble des résultats, la viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage de l'essai témoin.

Concentration (mg/ml)	0,05	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5
Gamme large (24h)	102%	n.t.	105%	n.t.	100%	n.t.	90%	n.t.	n.t.
Gamme restreinte n°1 (72h)	99%	100%	98%	99%	97%	96%	91%	80%	57%
Gamme restreinte n°2 (72h)	n.t.	102%	101%	99%	97%	94%	91%	78%	55%

L'abréviation n.t. signifie non testé.

Compte tenu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration de 300µg/ml, comme dose maximale, pour tester l'activité anti-prolifération du mélange de madécassoside et de terminoloside.

**b) Effet sur la prolifération cellulaire :**

Le principe du test repose sur l'évaluation de la croissance de kératinocytes humains hyperprolifératifs en absence et en présence du mélange de madécassoside et de terminoloside. La méthode est basée sur la mesure des densités cellulaires au niveau  
 5 des cultures stimulées par le KGF ou par l'EHL. Les densités cellulaires sont appréciées par un test colorimétrique au Rouge Neutre. L'absorbance des solutions est lue à 540 nm à l'aide d'un lecteur de microplaque.

4 concentrations du mélange de madécassoside et de terminoloside ont été testées :

10  $C_1=10 \mu\text{g/ml}$        $C_2=30 \mu\text{g/ml}$        $C_3=100 \mu\text{g/ml}$   $C_4=300\mu\text{g/ml}$

b.1) Stimulation par le KGF :

On prépare 6 lots tests :

15 Lot contrôle : cellules non stimulées ;

Lot témoin KGF : cellules stimulées par KGF à une concentration de 100ng/ml ;

4 Lots traités : cellules stimulées par KGF et traitées avec le mélange de madécassoside et de terminoloside ;

20

On mesure les densités optiques à  $t=0$  jours,  $t=2$  jours et  $t=5$  jours. Les moyennes des densités optiques, D.O., sont converties en densités cellulaires, cellules/puits, à partir de la droite de régression :  $D.O.=0,00355 \times (10^3 \text{ cellules/puits}) + 0,0018$

25 Le tableau suivant regroupe les densités cellulaires enregistrées au bout de 2 et 5 jours après activation des cellules par le KGF.

Stimulation KGF	Traitement 2 jours		Traitement 5 jours	
	Cellules/puits	Croissance cellulaire	Cellules/puits	Croissance cellulaire
Témoin sans KGF	56465 +/- 2486		115802 +/- 988	
Témoin avec KGF	85833 +/- 1742	100%	157616 +/- 6359	100%
C <sub>1</sub> et KGF	84388 +/- 2616	98% n.s.	161354 +/- 5165	102% n.s.
C <sub>2</sub> et KGF	85304 +/- 1312	99% n.s.	161248 +/- 4232	102% n.s.
C <sub>3</sub> et KGF	84317 +/- 1444	98% n.s.	152081 +/- 2536	96% n.s.
C <sub>4</sub> et KGF	83259 +/- 1960	97% n.s.	150071 +/- 7087	95% n.s.

L'abréviation n.s. signifie que le résultat n'est pas statistiquement significatif.

Les résultats obtenus ne montrent aucune modification significative de la croissance des cellules HaCaT stimulées par le KGF, après 2 ou 5 jours de culture en présence du mélange selon l'invention.

#### b.2) Stimulation par l'EHL :

10 On prépare 6 lots tests :

Lot contrôle : cellules non stimulées ;

Lot témoin KGF : cellules stimulées par EHL à une concentration de 3nM soit 90 ng/ml;

15 4 Lots traités : cellules stimulées par EHL et traitées avec le mélange de madécassoside et de terminoloside ;

On mesure les densités optiques à t=0 jours, t=2 jours et t=5 jours. Les moyennes des densités optiques, D.O., sont converties en densités cellulaires, cellules/puits, à partir de la droite de régression :  $D.O. = 0,00458 \times (10^3 \text{ cellules/puits}) + 0,041$

20

Le tableau suivant regroupe les densités cellulaires enregistrées au bout de 2 et 5 jours après activation des cellules par l'EHL.

	Traitement 2 jours		Traitement 5 jours	
Stimulation EHL	Cellules/puits	Croissance cellulaire	Cellules/puits	Croissance cellulaire
Témoin sans EHL	66668 +/- 1380		89180 +/- 2202	
Témoin avec EHL	875973 +/- 1400	100%	157616 +/- 6359	100%
C <sub>1</sub> et EHL	76764 +/- 799	101% n.s.	114584 +/- 2463	100% n.s.
C <sub>2</sub> et EHL	75891 +/- 1190	100% n.s.	115539 +/- 1261	101% n.s.
C <sub>3</sub> et EHLF	73408 +/- 1690	97% (p ≤ 0,05)	112428 +/- 1548	98% (p ≤ 0,05)
C <sub>4</sub> et EHL	72016 +/- 1597	95% (p ≤ 0,05)	93355 +/- 1429	82% (p ≤ 0,05)

L'abréviation n.s. signifie que le résultat n'est pas statistiquement significatif.

p ≤ 0,05 signifie que les résultats sont statistiquement significatifs, avec une erreur de 0,05%.

5

Les résultats obtenus montrent une légère diminution de la croissance des cellules HaCaT stimulées par l'EHL, après 2 ou 5 jours de culture en présence du mélange selon l'invention. Ce léger effet inhibiteur n'apparaît qu'aux fortes concentrations. A 300 µg/ml, le mélange de madécassoside et de terminoloside réduit de 18% par rapport au témoin la croissance des cellules activées par l'EHL après 5 jours de traitement.

10

### c) Conclusion :

En conclusion, le KGF, à une concentration de 100 ng/ml, et l'EHL, à une concentration de 90 ng/ml, stimulent la croissance des cellules HaCaT.

15

Le mélange de madécassoside et de terminoloside n'est pas capable, dans la gamme des concentrations testées, de moduler la croissance des cellules HaCaT stimulées par le KGF.

Le mélange selon l'invention est capable de moduler, de manière dose-dépendante, la croissance des cellules HaCaT stimulées par l'EHL. Le mélange de madécassoside et de terminoloside à la dose de 300µg/ml est capable de réduire de 18% la croissance des cellules HaCaT stimulées par l'EHL.

5

**Exemple 5 : mise en évidence de l'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside sur des kératinocytes humains en culture :**

10 Le sujet de cet exemple est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire du mélange selon l'invention sur la production et la libération de cytokines épidermiques pro-inflammatoires ; IL-1 $\alpha$  et PGE-2, par des kératinocytes humains en culture, soumis à un stress irritatif.

15 a) **Etude de la cytotoxicité du mélange de madécassoside et de terminoloside**

Cette étude de cytotoxicité a été menée de la même manière que dans l'exemple 4 et les mêmes résultats ont été obtenus.

20 De plus, l'étude de cytotoxicité a été complétée par un essai sur kératinocytes humains, souche K<sub>02-1</sub>H<sub>4</sub>, afin de confirmer la non-toxicité des concentrations sur les cellules cibles.

Une gamme de 8 concentrations, de 0,075 à 5 mg/ml, a été étudiée. Le mélange de madécassoside et de terminoloside préalablement solubilisé dans du DMSO a été  
25 ajouté au milieu de culture aux concentrations choisies, la concentration finale en DMSO est de 1%. La viabilité cellulaire a été effectuée par un test Rouge Neutre.

Les résultats confirment la non toxicité des concentrations inférieures ou égales à 2,5 mg/ml, après 72 heures d'incubation. La plus forte concentration testée, de 5 mg/ml, entraîne une inhibition de 30% de la capture du Rouge Neutre.

30 Le tableau ci-dessous regroupe les résultats. La viabilité cellulaire est exprimée en pourcentage de l'essai témoin.

Concentration (mg/ml)	0,075	0,1	0,25	0,5	0,75	1	2,5	5
Viabilité (72h)	98%	96%	102%	96%	93%	98%	95%	70%

Compte tenu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration de 1mg/ml, comme dose maximale, pour tester l'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside.

5

#### b) Activité anti-inflammatoire :

Le principe du test repose sur l'évaluation de la production de cytokines pro-inflammatoires par des kératinocytes humains, en réponse à un stress irritatif. La méthode est basée sur la mesure du taux intracellulaire d'IL-1 $\alpha$  et du taux de PGE-2 libéré dans le milieu extracellulaire par des kératinocytes cultivés en absence et en présence du mélange de madécassoside et de terminoloside et stimulé par le PMA, c'est-à-dire par le phorbol-1,2-myristate 13-acétate.

La mesure du taux de PGE-2 libéré dans le milieu extracellulaire est effectuée selon les instructions fournies par les laboratoires R&D SYSTEMS®. La mesure du taux intracellulaire d'IL-1 $\alpha$  est effectuée selon les instructions fournies par les laboratoires IMMUNOTECH®.

L'étude a été réalisée sur des kératinocytes isolés à partir de peau de prépuce de jeunes enfants, souche K<sub>02-1</sub>H<sub>4</sub>. 3 concentrations du mélange de madécassoside et de terminoloside ont été testées :

$$C_1 = 0,1 \text{ mg/ml}$$

$$C_2 = 0,5 \text{ mg/ml}$$

$$C_3 = 1,0 \text{ mg/ml}$$

##### b.1) Libération de PGE-2 :

Le tableau suivant regroupe les taux de PGE-2, exprimés en pg/ $\mu$ g de protéine, obtenu après activation des cellules ainsi que les taux basaux. La production de PGE-2 induite par le PMA et l'activité anti-inflammatoire (par la suite dénommée AAI) ont été calculés pour chaque concentration selon :

$$\text{PGE-2 production} = \text{PGE-2}_{\text{avec PMA}} - \text{PGE-2}_{\text{sans PMA}}$$



et  $AAI = [(PGE-2_{production_{cellules \text{ témoins}}} - PGE-2_{production_{cellules \text{ traitées}}}) / PGE-2_{production_{cellules \text{ témoins}}}] \times 100$

mélange de madécassoside et de terminoloside	0 mg/ml cultures témoins	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
PGE-2 sans PMA	4,96 +/- 0,52	4,96 +/- 0,52	4,96 +/- 0,52	4,96 +/- 0,52
PGE-2 avec PMA	39,34 +/- 2,64	18,73 +/- 0,67	10,69 +/- 0,50	6,60 +/- 0,44
PGE-2 production	34,38 +/- 2,64	13,77 +/- 0,67	5,73 +/- 0,50	1,64 +/- 0,44
AAI (%)		60%	83%	95%

- 5 L'exposition des kératinocytes au PMA se traduit par une très importante production et libération de PGE-2 dans les milieux de culture des cultures témoins. En effet, le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié par 8 après stimulation par le PMA. Ces résultats confirment que PGE-2 est une cytokine dont l'expression, la production et la libération peuvent être induites par un agent inflammatoire comme le PMA.

10 Les taux de PGE-2 enregistrés après stimulation par le PMA au niveau des cultures traitées avec le mélange de madécassoside et de terminoloside sont très nettement inférieurs à ceux observés au niveau des cultures témoins. Cet effet inhibiteur du mélange selon l'invention vis-à-vis de la libération du PGE-2 induite par le PMA est dose-dépendant. Les différences enregistrées au niveau des lots C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, et C<sub>3</sub> se sont révélées statistiquement significative ( $p \leq 0,01$ , test t de Student). La plus forte

15 concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside testée, de 1 mg/ml, est capable d'inhiber totalement la production de PGE-2 induite par le PMA.

## 20 b.2) Production d'IL-1 $\alpha$ intracellulaire :

Le tableau suivant regroupe les taux intracellulaires d'IL-1 $\alpha$ , exprimés en pg/ $\mu$ g de protéine, obtenu après activation des cellules ainsi que les taux basaux. La production

de d'IL-1 $\alpha$  induite par le PMA et l'activité anti-inflammatoire (par la suite dénommée AAI) ont été calculés pour chaque concentration selon :

$$\text{IL-1}\alpha \text{ production} = \text{IL-1}\alpha_{\text{avec PMA}} - \text{IL-1}\alpha_{\text{sans PMA}}$$

$$\text{et AAI} = [(\text{IL-1}\alpha \text{ production}_{\text{cellules témoins}} - \text{IL-1}\alpha \text{ production}_{\text{cellules traitées}}) / \text{IL-1}\alpha \text{ production}_{\text{cellules témoins}}] \times 100$$

mélange de madécassoside et de terminoloside	0 mg/ml cultures témoins	0,1 mg/ml	0,5 mg/ml	1 mg/ml
IL-1 $\alpha$ sans PMA	2,88 +/- 0,23	2,88 +/- 0,23	2,88 +/- 0,23	2,88 +/- 0,23
IL-1 $\alpha$ avec PMA	12,11 +/- 0,41	8,94 +/- 0,11	6,86 +/- 0,47	4,70 +/- 0,30
IL-1 $\alpha$ production	9,23 +/- 0,41	6,06 +/- 0,11	3,98 +/- 0,47	1,82 +/- 0,30
AAI (%)		34%	57%	80%

L'exposition des kératinocytes au PMA se traduit par une très importante production et libération d'IL-1 $\alpha$  dans les milieux de culture des cultures témoins. En effet, le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié par 4 après stimulation par le PMA. Ces résultats confirment que IL-1 $\alpha$  est une cytokine dont l'expression, la production et la libération peuvent être induites par un agent inflammatoire comme le PMA.

Les taux d'IL-1 $\alpha$  enregistrés après stimulation par le PMA au niveau des cultures traitées avec le mélange de madécassoside et de terminoloside sont nettement inférieurs à ceux observés au niveau des cultures témoins. Cet effet inhibiteur du mélange selon l'invention vis-à-vis de la production et de l'accumulation d'IL-1 $\alpha$  induite par le PMA est dose-dépendant. Les différences enregistrées au niveau des lots C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub>, et C<sub>3</sub> se sont révélées statistiquement significative ( $p \leq 0,01$ , test t de Student). La plus forte concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside testée, de 1 mg/ml, est capable de réduire de 80% la production d'IL-1 $\alpha$  induite par le PMA.

**c) Conclusion :**

L'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside a été évaluée sur un modèle in vitro par sa capacité à moduler la production de deux cytokines épidermiques, PGE-2 et IL-1 $\alpha$ , qui jouent un rôle clé dans les étapes du processus inflammatoire. L'étude a été réalisée sur des cultures de kératinocytes humains normaux stimulés par un agent irritant, le PMA.

Cet exemple montre que le PMA, à une dose non toxique de 10ng/ml, induit, d'une part, une très nette augmentation du taux d'IL-1 $\alpha$  intracellulaire et provoque, d'autre part, la production et la libération de PGE-2 dans les milieux de culture.

Le mélange de madécassoside et de terminoloside est capable de réduire très nettement la libération du PGE-2 induite par le PMA. Le mélange à la dose de 1 mg/ml est capable d'inhiber totalement la libération de PGE-2.

Le mélange selon l'invention est capable de moduler, de manière dose-dépendante, la production et l'accumulation intracellulaire d'IL-1 $\alpha$  induite par le PMA.

Compte tenu du rôle important de ces deux cytokines dans le processus inflammatoire, la capacité manifestée par le mélange de madécassoside et de terminoloside à moduler, de manière dose-dépendante, l'expression et la libération de PGE-2 ainsi que la production d'IL-1 $\alpha$  par des kératinocytes stimulés in vitro, peut être considérée comme une activité anti-inflammatoire.

**Exemple 6 : évaluation de l'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside sur des kératinocytes humains en culture :**

Le sujet de cet exemple est d'évaluer l'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside sur la production de TNF- $\alpha$  et de IL-8 induite par l'interféron  $\gamma$ .

a) Etude de la cytotoxicité du mélange de madécassoside et de terminoloside

Cette étude de cytotoxicité a été menée de la même manière que dans l'exemple 4 et les mêmes résultats ont été obtenus.

Compte tenu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration de 1mg/ml, comme dose maximale, pour tester l'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside.

b) Effet de l'interféron- $\gamma$  sur la production de cytokines épidermiques

L'étude est réalisée sur des kératinocytes humains normaux.

Les cellules sont d'abord traitées avec 4 concentrations d'interféron-gamma (IFN- $\gamma$ ), pendant 24 heures.

Ensuite, on mesure les médiateurs de l'inflammation au niveau des cultures témoins et traitées par IFN- $\gamma$  par un dosage d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  dans les surnageants de culture et par un dosage des protéines cellulaires. La méthode de mesure utilisée est le test au bleu de Coomassie, c'est une méthode normalisée.

Les résultats sont donnés dans les tableaux suivants :

IL-8 (pg/ $\mu$ g protéines)	Témoin	Interféron- $\gamma$ (U/ml)			
	0	100	500	1000	2000
Moyenne	0,077	0,980	1,301	1,991	2,917
Ecart-type	0,060	0,119	0,102	0,113	0,138

TNF- $\alpha$ (pg/ $\mu$ g protéines)	Témoin	Interféron- $\gamma$ (U/ml)			
	0	100	500	1000	2000
Moyenne	3,260	3,198	8,605	10,773	14,545
Ecart-type	0,519	0,744	1,195	1,673	1,256

Les résultats obtenus montrent que l'interféron, dans la gamme des concentrations testées, de 100 à 2000 U/ml, induit, de manière dose-dépendante, une nette stimulation de la production de TNF- $\alpha$  et de IL-8. La lettre U est l'abréviation d'unité ; 1 U correspond à une unité d'interféron- $\gamma$ .

- 5 Dans le cas de la cytokine épidermique TNF- $\alpha$ , le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié respectivement par 3.3 et par 4.5 après stimulation par l'interféron à 1000 et 2000 U/ml.

Dans le cas de la cytokine épidermique IL-8, le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié respectivement par 26 et par 38 après stimulation  
10 par l'interféron à 1000 et 2000 U/ml.

Ces résultats confirment que l'interféron est capable de stimuler l'expression, la production et la libération de ces deux cytokines épidermiques. Au vu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration 1000 U/ml pour stimuler les kératinocytes.

15

#### **c) Activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminolosite**

L'étude est réalisée sur des kératinocytes humains normaux.

- 20 Les cellules sont d'abord traitées, pendant 48 h, avec le produit à l'étude avant induction du stress irritatif.

Ensuite, un stress irritatif est induit par addition d'une solution d'interféron-gamma, IFN- $\gamma$ .

Les cellules ainsi activées sont incubées pendant 24h en présence du produit à l'étude.

- 25 Enfin, on dose les taux d'IL-8 et de TNF- $\alpha$  dans les surnageants de culture et on dose aussi les protéines cellulaires.

##### c.1) Résultats sur la cytokine IL-8 :

- 30 Les tableaux suivants regroupent les taux d'IL-8, exprimé en pg/ $\mu$ g de protéines, obtenus après activation des cellules ainsi que le taux basal. L'activité anti-inflammatoire (AAI) a été calculée pour chaque concentration selon la formule :

$$A.A.I = [(IL-8_{(cellules\ témoins + IFN)} - IL-8_{(cellules\ traitées + IFN)}) / IL-8_{(cellules\ témoins + IFN)}] \times 100$$

*α) Taux d'IL-8 dans les cellules traitées avec un mélange selon l'invention*

- 5 Les résultats, des échantillons de kératinocytes traités avec le mélange de madécassoside et de terminoloside, sont donnés dans le tableau suivant :

	Control sans IFN	Témoin avec IFN	IFN et mélange de madécassoside et de terminoloside			
		0 mg/ml	0.1mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1mg/ml
IL-8 (pg/μg prot.)	0,06 +/- 0,01	1,03 +/- 0,04	0,72 +/- 0,09	0,53 +/- 0,06	0,39 +/- 0,03	0,39 +/- 0,02
AAI			31%	49%	62%	63%

- 10 Les résultats obtenus montrent une très importante production et libération de IL-8 dans les milieux des cultures témoins après stimulation par l'Interféron  $\gamma$ , à une concentration de 100U/ml. Le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié par 18 après stimulation par l'IFN- $\gamma$ .

- D'autre part, ces résultats montrent aussi une très importante diminution, dose dépendante, du taux de IL-8 au niveau des cultures traitées stimulées par l'IFN- $\gamma$ . La production de IL-8 induite par l'interféron est très nettement inférieure à celle observée au niveau des cultures du lot témoin. La plus forte concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside est capable d'inhiber de 63% la libération de IL-8 induite par l'IFN- $\gamma$ . Les différences enregistrées au niveau des lots C1, C2, C3 et C4 se sont révélées statistiquement significatives ( $p \leq 0.01$ , test t de Student) par rapport au lot
- 20 témoin.

#### c.2) Résultats sur la cytokine TNF- $\alpha$ :

- 25 Les tableaux suivants regroupent les taux de TNF- $\alpha$  (pg/mg protéines) obtenus après activation des cellules ainsi que le taux basal L'activité anti-inflammatoire (AAI) a été calculée pour chaque concentration selon la formule :

$$A.A.I = [(TNF-\alpha_{\text{cellules témoins} + IFN} - TNF-\alpha_{\text{cellules traitées} + IFN}) / TNF-\alpha_{\text{cellules témoins} + IFN}] \times 100$$

*α) Taux de TNF-α dans les cellules traitées avec un mélange selon l'invention*

- 5 Les résultats, des échantillons de kératinocytes traités avec le mélange de madécassoside et de terminoloside, sont donnés dans le tableau suivant :

	Control sans IFN	Témoin avec IFN	IFN et mélange de madécassoside et de terminoloside			
		0 mg/ml	0.1mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1mg/ml
TNF-α (pg/μg prot.)	2,39 +/- 0,16	5,26 +/- 0,31	4,95 +/- 0,22	4,97 +/- 0,24	4,67 +/- 0,15	3,92 +/- 0,10
AAI			6%	6%	11%	26%

- 10 Les résultats obtenus montrent une importante production et libération de TNF-α dans les milieux des cultures témoins après stimulation par l'Interféron γ, à une concentration de 100U/ml. Le taux de base enregistré au niveau des cultures non stimulées est multiplié par 2,2 après stimulation par l'IFN-γ, à une concentration de 1000 U/ml.

- 15 Les résultats obtenus montrent aussi une légère diminution, dose dépendante, du taux de TNF-α au niveau des cultures traitées stimulées par l'IFN-γ. La plus forte concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside est capable d'inhiber de 26% la libération de TNF-α induite par l'IFN-γ.

**d) Conclusion**

20

- L'activité anti-inflammatoire du mélange de madécassoside et de terminoloside a été évaluée sur un modèle in vitro par sa capacité à moduler la production de deux cytokines épidermiques, IL-8 et TNF-α, qui jouent un rôle clé dans les étapes du processus inflammatoire. L'étude a été réalisée sur des cultures de kératinocytes humains normaux stimulés par un agent irritant, l'IFN-γ.
- 25

Cet exemple montre que l'IFN- $\gamma$ , à une dose non toxique de 1000 U/ml, induit, d'une part, une très nette augmentation du taux d'IL-8 et provoque, d'autre part, la production et la libération de TNF- $\alpha$  dans les milieux de culture.

5 Le mélange selon l'invention est capable de moduler, de manière dose-dépendante, la production et l'accumulation intracellulaire d'IL-8 induite par l'IFN- $\gamma$ . Le mélange à la dose de 1 mg/ml est capable d'inhiber de 63% la libération de IL-8.

Le mélange de madécassoside et de terminoloside est capable de réduire la libération du TNF- $\alpha$  induite par l'IFN- $\gamma$ . Le mélange à la dose de 1 mg/ml est capable d'inhiber de 26% la libération de TNF- $\alpha$ .

10

Si nous devons extrapoler les résultats obtenus en système clos, c'est-à-dire les tests effectués in-vitro, à des hypothèses de mécanisme d'activités cliniques effectives, in-vivo, nous pourrions objectiver les observations suivantes :

15 Le TNF- $\alpha$  est un des activateurs de la production d'IL8, non seulement au niveau kératinocytaire, mais aussi et surtout aux niveaux macrophagiques et lymphocytaires B.

20 Le fait que le mélange d'une part, ne diminue que partiellement l'expression du TNF- $\alpha$ , est, au delà de la modération de l'expression de signaux inflammatoires, la manifestation d'un contrôle de l'activité d'un système immunitaire non déprimé puisque TNF- $\alpha$  remplit un rôle majeur dans le contrôle et la surveillance cellulaires de la peau, notamment de la phase apoptotique.

25 D'autre part ce mélange diminue l'expression d'IL8 avec pour conséquence une atténuation du chimiotactisme des polynucléaires neutrophiles et basophiles et les conséquences sur la diminution de la « pression » protéolytique, avec pour conséquence, la modération de la propagation du signal inflammatoire, et en outre, la diminution de la perméabilité vasculaire. Une autre conséquence est la moindre activation en retour des lymphocytes T de la peau par IL8.

30



**Exemple 7 : effet du mélange de madécassoside et de terminoloside vis-à-vis de la production de SKALP par des kératinocytes humains :**

Le sujet de cet exemple est d'évaluer l'activité anti-psoriasis du mélange de  
 5 madécassoside et de terminoloside sur l'expression de la cytokératine 10, particulièrement de l'Elafin, ci après abrégées CK10 ou SKALP, par des kératinocytes en état de différenciation.

10                   **a) Etude de la cytotoxicité du mélange de madécassoside et de terminoloside**

Cette étude de cytotoxicité a été menée de la même manière que dans l'exemple 4 et les mêmes résultats ont été obtenus.

Compte tenu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration de 1mg/ml,  
 15 comme dose maximale, pour tester l'activité anti-psoriasis du mélange de madécassoside et de terminoloside.

**b) Expression de SKALP et différenciation des kératinocytes**

20 L'étude est réalisée sur des kératinocytes humains normaux.

Les cellules sont mises en culture dans trois milieux différents :

- Milieu de « prolifération » : milieu KGM avec gf, growth factor ou facteur de croissance, milieu supplémenté en facteurs de croissance
- Milieu de « différenciation normale » : milieu KGM sans gf, milieu déplété  
 25 en facteurs de croissance
- Milieu de « différenciation type psoriasis » : milieu KGM avec SVF, milieu supplémenté en sérum de veau foetal, ci après dénommé SVF (5%).

Ensuite, on mesure le taux de SKALP dans les milieux d'incubation des cellules cultivées pendant 72h dans ces différents milieux. Le test de mesure est le test ELISA  
 30 décrit dans Skin pharmacology and applied skin physiology, 2002 ;15 :152-261.

Les résultats sont les suivants :

1. Milieu KGM avec gf	SKALP = 1.17 +/- 0.18 ng/μg protéines	100
2. Milieu KGM sans gf	SKALP = 1.34 +/- 0.20 ng/μg protéines	115
3. Milieu KGM avec FCS	SKALP = 2.76 +/- 0.08 ng/μg protéines	236

- 5 Les résultats obtenus montrent que l'expression de SKALP varie en fonction de l'état de différenciation des cellules. La production de SKALP est très nettement augmentée lorsque les cellules sont cultivées en milieu contenant du SVF. Le taux de SKALP en milieu de différenciation « type psoriasis » est multiplié par 2,4 par rapport au taux de SKALP enregistré en milieu de prolifération.

10

#### c) Effet « anti-psoriasis » des produits étudiés

- Les conditions d'essai sont les suivantes: on met en culture des cellules en milieu de différenciation « normale », c'est-à-dire en milieu KGM sans gf, et en milieu de  
15 différenciation « type psoriasis », c'est-à-dire en milieu KGM avec SVF, en absence, ce qui correspond au lot Témoin, et en présence du mélange selon l'invention, pendant 72h.

On dose ensuite le taux de SKALP dans les surnageants de culture. On dose aussi les protéines cellulaires.

20

Les tableaux suivants regroupent les taux de SKALP, exprimés en ng/μg protéines, obtenus après culture des cellules en milieu KGM sans gf et en milieu KGM avec FCS.

#### α) Culture en milieu de Différenciation « normale » : Milieu KGM sans gf

25

	KGM avec gf	KGM sans gf	KGM sans gf + mélange selon l'invention			
		0 mg/ml	0.1mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1mg/ml
SKALP (ng/μg prot.)	1,17 +/- 0,18	1,34 +/- 0,20	1,01 +/- 0,24	1,15 +/- 0,16	1,05 +/- 0,18	0,53 +/- 0,14
SKALP PRODUCTION		100%	75%	86%	78%	40%

Les résultats obtenus montrent une diminution du taux de SKALP au niveau des cultures traitées avec le mélange selon l'invention. Seule la différence enregistrée au niveau du lot C4 s'est révélée statistiquement significative ( $p \leq 0.01$ , test t de Student) par rapport au Témoin « KGM sans gf ». La plus forte concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside est capable d'inhiber de 60% la sécrétion de SKALP en milieu de différenciation « normale ».

*β) Culture en milieu de Différenciation « type Psoriasis » : Milieu KGM avec FCS*

	KGM avec gf	KGM avec FCS	KGM avec FCS + mélange selon l'invention			
		0 mg/ml	0.1mg/ml	0.25 mg/ml	0.5 mg/ml	1mg/ml
SKALP (ng/μg prot.)	1,13 +/- 0,19	2,76 +/- 0,08	2,22 +/- 0,24	2,34 +/- 0,12	2,06 +/- 0,15	1,64 +/- 0,10
SKALP PRODUCTION		100%	80%	85%	75%	60%

10

Les résultats obtenus montrent une diminution dose-dépendante du taux de SKALP au niveau des cultures traitées avec le mélange selon l'invention. Les différences enregistrées au niveau des lots C1, C2, C3 et C4 se sont révélées statistiquement significatives ( $p \leq 0.01$ , test t de Student) par rapport au Témoin « KGM avec FCS ». La plus forte concentration du mélange de madécassoside et de terminoloside est capable d'inhiber de 40% la sécrétion de SKALP en milieu de différenciation « type psoriasis ».

15

**d) Conclusion**

20

L'activité anti-psoriasis du mélange de madécassoside et de terminoloside a été évaluée sur un modèle in vitro par sa capacité à moduler la sécrétion de SKALP, qui jouerait un rôle clé dans les maladies du type psoriasis. L'étude a été réalisée sur des cultures de kératinocytes humains normaux dans différents milieux.

25

Cet exemple montre que l'expression de SKALP varie en fonction de l'état de différenciation des cellules et augmente très nettement dans un milieu « type psoriasis », c'est à dire contenant du FCS.

Le mélange selon l'invention est capable d'inhiber, de manière dose-dépendante, la sécrétion de SKALP en milieu de différenciation « normale » et en milieu de différenciation « type psoriasis ». Le mélange à la dose de 1 mg/ml est capable d'inhiber de 60% la sécrétion de SKALP en milieu de différenciation « normale » et de 40% la sécrétion de SKALP en milieu de différenciation « type psoriasis ».

- Compte tenu du rôle important de la sécrétion de SKALP dans le psoriasis, la capacité manifestée par le mélange de madécassoside et de terminoloside à moduler, de manière dose-dépendante, la sécrétion de SKALP par des kératinocytes dans différents milieux de différenciation in vitro, peut être considérée comme une activité anti-psoriasis.
- Ce résultat démontre l'effet protecteur du mélange selon l'invention vis à vis des cellules épidermiques dans le contexte protéolytique caractérisant un modèle de type psoriasis, selon un mode de désensibilisation cellulaire dans le contexte de la réaction hyperplasique inflammatoire.

15

**Exemple 8 : effets du mélange de madécassoside et de terminoloside sur l'activation de NF $\kappa$ B dans des cultures de fibroblastes :**

- Le « Nuclear factor- $\kappa$ B » est un facteur de transcription qui gouverne l'expression des gènes codants les cytokines, les chimiokines, les facteurs de croissance, les molécules d'adhésion cellulaire et certaines protéines à phase brève. NF $\kappa$ B est activé par plusieurs agents, incluant les cytokines, les radicaux libres, les particules inhalées, l'irradiation ultraviolet, et des bactéries ou des virus.

- Les agents inflammatoires tels que le TNF- $\alpha$  induisent la transcription de gènes pro-inflammatoires-cibles via l'activation, entre autres, du facteur de transcription NF $\kappa$ B. En conditions non stimulées, le facteur de transcription NF $\kappa$ B est lié dans le cytoplasme à une protéine inhibitrice I $\kappa$ B. La liaison de TNF- $\alpha$  à son récepteur conduit à la phosphorylation de ce complexe et à la dissociation de NF $\kappa$ B de l'inhibiteur. NF $\kappa$ B activé migre alors dans le noyau et se fixe sur une séquence promotrice, appelée séquence consensus NF $\kappa$ B, spécifique des gènes trans-activés par NF $\kappa$ B. Cette séquence conduit à la transcription des gènes-cibles. L'activation de NF $\kappa$ B peut donc se mesurer en mettant en contact des extraits nucléaires stimulés ou non avec des

séquences oligonucléotidiques consensus NFκB immobilisées sur des supports et en quantifiant NFκB lié à l'aide d'une méthode immuno-enzymatique, telle que ELISA avec anticorps anti- NFκB.

- 5 Cette étude permet d'évaluer les effets du mélange selon l'invention sur l'activation de NFκB en utilisant une méthode spécifique très sensible basée sur la mesure de la liaison du facteur de transcription NFκB à la séquence oligonucléotidique consensus immobilisée sur support plastique. NFκB lié est secondairement reconnu par un anticorps spécifique anti-NFκB.
- 10 Cet essai a été réalisé sur des noyaux isolés de fibroblastes humains normaux.

Le milieu de culture est le DMEM qui comprend :

- L-glutamine 2mM
- pénicilline 50 UI/ml streptomycine 50 µg/ml
- 15    ▪ sérum de veau foetal 10 % (v/v) pour la pré-culture puis passage en milieu sans sérum

Produits à l'essai	Solution-stock	Dilution	Concentration finale testée
Mélange selon l'invention	10 % dans milieu de culture	Milieu de culture	0.01 %

Références	Solution-stock	Dilution	Concentration finale testée
<b>Dexaméthasone</b> (Sigma D1756)	10 <sup>-2</sup> M en DMSO	Milieu de culture	0.1 µM
<b>Sulfasalazine</b> (Sigma S0883, PM 398.4)	1 M en DMSO	Milieu de culture	5 mM

**a) Étude de la cytotoxicité du mélange de madécassoside et de terminoloside**

Cette étude de cytotoxicité a été menée de la même manière que dans l'exemple 4 et les mêmes résultats ont été obtenus.

Compte tenu de ces résultats, on a décidé de retenir la concentration de 0,01%, comme dose maximale, pour tester l'activité anti-psoriasis du mélange de madécassoside et de terminoloside.

**b) Traitements, extractions et dosages**

Les fibroblastes ont été pré-cultivés en flacons de 175 cm<sup>2</sup> en milieu DMEM à 10 % en volume de SVF jusqu'à confluence, puis le milieu de culture a été remplacé par du milieu DMEM sans sérum.

Les cellules ont ensuite été cultivées en présence des produits à l'essai ou des références pendant 1 heure. L'agent pro-inflammatoire « transforming growth factor alpha » (TNF- $\alpha$ , à 25 ng/ml final; Sigma T0157) a ensuite été ajouté au milieu de culture et les cellules ont été à nouveau incubées pendant 1 heure à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

Après incubation, les cellules ont été récoltées sur glace et les noyaux cellulaires des différents échantillons ont été isolés à l'aide du kit Sigma NUC-101 suivant le protocole préconisé par le fournisseur. La quantité de protéines de chaque extrait de noyaux a été déterminée à l'aide du kit de dosage Biorad 500-0116.

La quantité de NF $\kappa$ B activé, lié à l'oligonucléotide spécifique, a été mesurée sur une même quantité d'extrait nucléaire de chaque échantillon, soit 50  $\mu$ l, dilué à moitié, après révélation à l'aide d'un anticorps spécifique anti-NF $\kappa$ B. Ce dosage a été réalisé à l'aide du kit de dosage Mercury transfactor NF $\kappa$ B, BD Biosciences K2058-1, selon le protocole préconisé par le fournisseur.

### c) Dosage de NFκB

Les résultats sont donnés dans le tableau suivant :

Traitement	NFκB (UA)	moyenne	% témoin	p
Témoin non traité	10,71 8,39 8,90 10,19	9,55	100	-
Contrôle sans TNF-α	0,00 0,62 0,62 -0,21	0,26	3	p<0 01
Sulfasalazine 5mM	4,93 4,01 2,88 4,93	4,19	44	p<0 01
Dexaméthasone 0,1 μM	10,94 7,3 9,90 9,67	9,46	99	p>0,05
Mélange selon l'invention 0,01%	10,16 6,79 9,63 9,63	9,05	95	p>0,05

5

UA représente les unités arbitraires de NFκB dans l'extrait, c'est la différence entre la valeur mesurée et le bruit de fond.

Le taux basal de NFκB dans les noyaux de fibroblastes est très faible, cf contrôle sans  
10 TNF-α.

Le traitement par le TNF- $\alpha$  à 25 ng/ml a fortement activé le facteur de transcription NF $\kappa$ B, d'un facteur 37 environ par rapport au contrôle sans TNF- $\alpha$ . Des contrôles utilisant un excès d'oligonucléotide ont permis de montrer que la quasi-totalité de la réponse observée était spécifique de la liaison de NF $\kappa$ B.

5

La sulfasalazine à 5 mM, inhibiteur de référence de la translocation de NF $\kappa$ B, a nettement réduit l'activation du facteur de transcription NF $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$ , 44 % du témoin avec TNF- $\alpha$ ,  $p < 0,01$ .

- 10 La dexaméthasone à 0.1  $\mu$ M, n'a pas inhibé la translocation nucléaire de NF $\kappa$ B induite par le TNF- $\alpha$ . En faits, la dexaméthazone réprime la trans-activation des gènes induite par NF $\kappa$ B, mais n'inhibe pas l'activation de NF $\kappa$ B et sa translocation vers le noyau. Il y a ainsi un effet inhibiteur de la transcription mais pas d'effet sur la translocation de NF $\kappa$ B ; l'action de la dexaméthazone a lieu au niveau nucléaire, via le récepteur aux glucocorticoïdes, elle est donc postérieure à l'action de la sulfasalazine.
- 15

Le produit selon l'invention testé à 0.01 % n'a pas modifié de façon significative l'activation de NF $\kappa$ B induite par TNF- $\alpha$ , 95 % du témoin. Ce résultat n'exclut pas une activité anti-inflammatoire via un autre mécanisme

20

#### d) Conclusion

- La non ingérence du madécassoside et de son isomère dans l'activation du NF $\kappa$ B a pour conséquence la transcription autorisée des ligands, tels que les cytokines et les chimioquinas, inflammatoires qui rendent la cellule opérationnelle dans un cas d'agression antigénique pathogène.
- 25

Le madécassoside et son isomère n'ont aucune interaction avec ou contre l'activation du NF $\kappa$ B produit par les fibroblastes.

- La modération des ligands inflammatoires dans les dérèglements auto-immuns, IL1, IL8, TNF- $\alpha$ , PGE2 au niveau membranaire, indique que le madécassoside et son isomère agirait plus au niveau transductionnel (meilleure tolérance en cas de dérive
- 30



inflammatoire), et au niveau des systèmes d'expression et/ou de synthèse des protéines, peptides, ou autres ligands (moindre expression intra-cellulaire des IL).

### Revendications

1. Procédé de préparation d'un extrait de *Centella asiatica* contenant un mélange de madecassoside et de terminoloside, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes :
  - a) extraction des parties aériennes de *Centella asiatica* au moyen d'un solvant alcoolique ;
  - b) passage sur résine anionique de la solution alcoolique obtenue à l'étape a) ;
  - 10 c) délipidation sélective par extraction liquide/liquide de l'éluat obtenu à l'étape b) ;
  - d) concentration de la phase hydro-alcoolique délipidée jusqu'en phase aqueuse avec filtrations successives ;
  - e) passage successif sur résine cationique puis sur résine anionique de la phase aqueuse obtenue à l'étape d) ;
  - 15 f) stabilisation de la phase aqueuse obtenue à l'étape e) par addition d'alcool ;
  - g) chromatographie sélective de la phase hydro-alcoolique pré-purifiée obtenue à l'étape f) ;
  - 20 h) récupération du mélange de madecassoside et de terminoloside dans sa forme finale.
2. Procédé d'extraction selon la revendication 1, caractérisé en ce que la résine anionique utilisée à l'étape b) est une résine anionique forte avec des groupements fonctionnels du type ammonium quaternaire.
 

25
3. Procédé d'extraction selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la résine cationique utilisée à l'étape e) est une résine cationique forte avec des groupements fonctionnels du type sulfonates.
 

30
4. Procédé d'extraction selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la résine anionique utilisée à l'étape e) est une résine

anionique forte avec des groupements fonctionnels du type ammonium quaternaire.

- 5 5. Procédé d'extraction selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le solvant utilisé lors de la chromatographie sélective est un mélange d'eau et d'éthanol dans des proportions eau/éthanol variant de 50/50 à 90/10 en volume / volume.
- 10 6. Procédé d'extraction selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que la phase stationnaire utilisée lors de la chromatographie sélective est une phase stationnaire apolaire, notamment une phase stationnaire constituée de silices apolaires greffées, les greffons apolaires ayant 2 à 18 atomes de carbone.
- 15 7. Procédé d'extraction selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que le mélange de madecassoside et de terminoloside est obtenu avec une pureté supérieure à 95% en masse par rapport au poids de l'extrait.
- 20 8. Extrait de *Centella asiatica* susceptible d'être obtenu par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 7, contenant plus de 95% en masse d'un mélange de madecassoside et de terminoloside.
- 25 9. Extrait de *Centella asiatica* selon la revendication 8 caractérisé en ce que le mélange a un rapport massique en madecassoside : totum compris entre 30% et 70%.
- 30 10. Extrait de *Centella asiatica* contenant plus de 95% en masse d'un mélange de madecassoside et de terminoloside, dans un rapport massique en madecassoside : totum exprimé en masse compris entre 30% et 70%, en tant qu'agent anti-inflammatoire.

11. Médicament comprenant un extrait de *Centella asiatica* selon l'une quelconque des revendications 8 à 9 et un support pharmaceutiquement acceptable.
- 5 12. Médicament selon la revendication 10 destiné à réguler les mécanismes inflammatoires.
13. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 12 destiné au traitement des maladies auto-immunes, des maladies inflammatoires chroniques ou des maladies intestinales.
- 10 14. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 13 destiné au traitement du psoriasis, du vitiligo, du pityriasis, des sclérodermies, des dermatoses bulleuses ou de l'arthrite rhumatoïde.
- 15 15. Médicament selon l'une quelconque des revendications 10 à 14 destiné à la prévention et au traitement des dérives inflammatoires chroniques liées au vieillissement et ses conséquences.
- 20 16. Médicament selon la revendication 15 destiné à la prévention et au traitement des maladies choisies parmi les sensibilisations anaphylactiques, les anomalies pigmentaires de la peau, l'hypervascularisation dermique, les fissurations inflammatoires.
- 25 17. Médicament selon la revendication 15 destiné à réguler l'homéostasie tissulaire dermique.
18. Composition cosmétique comprenant un extrait de *Centella asiatica* selon l'une quelconque des revendications 8 à 9 et un support cosmétiquement acceptable
- 30 19. Utilisation cosmétique de la composition selon la revendication 18, pour prévenir toute dérive pathologique auto-immune pouvant résulter du vieillissement de la peau.

20. Utilisation cosmétique de la composition selon la revendication 18 ou de l'extrait selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, pour retarder le vieillissement naturel de la peau.

5

21. Utilisation cosmétique de la composition selon la revendication 18 ou de l'extrait selon l'une quelconque des revendications 8 à 10, pour prévenir le vieillissement accéléré de la peau soumise aux agressions extérieures, notamment pour prévenir le vieillissement photo-induit de la peau.

PCT Application  
PCT/FR2003/003651

